

B14

METHOD AND DEVICE FOR ELECTRICALLY BORING HOLE

Patent Number: JP2131585
Publication date: 1990-05-21
Inventor(s): ITO HIROYASU
Applicant(s): HAMAMATSU PHOTONICS KK
Requested Patent: ☐ JP2131585
Application Number: JP19880284178 19881110
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/87; C12M1/00; C12N13/00
EC Classification:
Equivalents: JP1955260C, JP6087783B

Abstract

PURPOSE:To selectively and readily take a taking-in material in a specific site of a cell by positioning a taking-in part of cell on either one side of direction of line of electric force, heating a cell part on other side and applying direct current pulse electric field in providing small hole for taking-in material in the cell by an electrically boring method.

CONSTITUTION:A medium liquid 17 containing a cell 16 is put in a recessed part 11 formed in the central part of a substrate 11 and DNA taking-in part of the cell 16 is positioned on one side in the direction of line of electric force by a method rotating and moving the substrate 11 while observing using an optical microscope 3. Then a part of cell 16 on other side in the direction of line of electric force is irradiated with laser beam L1 from laser light source 4 and selectively heated. At the same time, electricity is sent to electrodes 13a and 13b from a direct current pulse electric source 2 and direct current pulse electric field is applied to the medium liquid 17 to form small holes. Thereby DNA, etc., is taken in from the small holes for a long period, since repair of small holes in unheated position of cell 16 is slow.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-131585

⑮ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)5月21日

C 12 N 15/87
C 12 M 1/00
C 12 N 13/00

B 8717-4B
7329-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全6頁)

⑭ 発明の名称 細胞電気穿孔法および装置

⑯ 特 願 昭63-284178

⑰ 出 願 昭63(1988)11月10日

⑱ 発 明 者 伊 藤 博 康 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会
社内

⑲ 出 願 人 浜松ホトニクス株式会 静岡県浜松市市野町1126番地の1
社

⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 芳樹 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞電気穿孔法および装置

2. 特許請求の範囲

1. 媒液中に含まれた細胞の細胞膜に直流パルス電場を印加することで小孔を形成し、この小孔を介して前記媒液中にあらかじめ含まれている被取込物を前記細胞中の取込部分に取り込む細胞電気穿孔法において、

前記直流パルス電場の電気力線方向の一方側に前記細胞の取込部分を位置せしめる第1のステップと、

前記電気力線方向の他方側の前記細胞部分を選択的に加熱すると共に、前記直流パルス電場を印加する第2のステップとを備えることを特徴とする細胞電気穿孔法。

2. 前記細胞はあらかじめ染色され、前記第2のステップは前記電気力線方向の他方側の細胞

部分を選択的にレーザ光照射して加熱することを特徴とする請求項1記載の細胞電気穿孔法。

3. 前記電気力線方向の他方側の細胞部分はあらかじめ染色され、前記第2のステップは前記細胞全体をレーザ光照射して前記染色部分を加熱することを特徴とする請求項1記載の細胞電気穿孔法。

4. 媒液中に含まれた複数の細胞の細胞膜に直流パルス電場を印加することで小孔を形成し、この小孔を介して前記複数の細胞中の所定の細胞に前記媒液中にあらかじめ含まれた被取込物を取り込む細胞電気穿孔法において、

前記所定の細胞以外の細胞を選択的に加熱すると共に、前記直流パルス電場を印加するステップを備えることを特徴とする細胞電気穿孔法。

5. 前記選択的な加熱は、前記所定の細胞以外の細胞を選択的にレーザ光照射することにより行なうことを特徴とする請求項4記載の細胞電気穿孔法。

6. 前記選択的な加熱は、前記所定の細胞以

外の細胞を選択的に染色してレーザー光照射することにより行なうことを特徴とする請求項4記載の細胞電気穿孔法。

7. 細胞を含む媒液を入れるための凹部が形成され、かつ前記媒液に電場を印加するための一対の電極が前記凹部に設けられた基体と、

前記一対の電極に直流パルス電圧を印加するための電源手段と、

前記基体の凹部に入れられた媒液中の細胞を観察するための顕微鏡と、

前記基体の凹部に入れられた媒液中の細胞を加熱するためのレーザー光源とを備えることを特徴とする細胞電気穿孔装置。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は細胞を含む媒液に高圧パルス電場を印加し、細胞膜に小孔を形成することによってDNAなどを細胞中に取り込む細胞電気穿孔法と、これに用いられる細胞電気穿孔装置に関するもの

中止すれば小孔は修復される。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、電気穿孔法による場合には、原則として直流パルス電場中の全ての細胞の細胞膜に小孔が形成されるため、多数の細胞中の特定の細胞のみにDNAを取り込ませることはできない。また、この小孔は直流パルス電場の電気力線方向の一方および他方の端部に等しく形成されるので、1個の細胞の特定の部位、例えば細胞の核あるいはこの近傍にのみDNAを取り込ませることは困難である。

そこで本発明は、媒液中の複数の細胞中の特定の細胞あるいは1個の細胞の特定の部位にのみ、DNAの如き被取込物を取り込むことのできる細胞電気穿孔法と、このために用いられる装置を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明に係る細胞電気穿孔法は、媒液中に含まれた細胞の細胞膜に直流パルス電場を印加することで小孔を形成し、この小孔を介して媒液中にあ

である。

〔従来の技術〕

バイオテクノロジーの進展に伴ない、細胞中にDNAなどの被取込物を取り込むことが重要になっている。このような操作を行なうためには、細胞膜に小孔を形成することが必要になるが、この技術の第1のものとして、レーザー光による穿孔法である。これは、細胞の特定の部位にレーザービームを照射して加熱し、細胞膜に小孔を形成するものがある。これによれば、DNAはこの小孔を介して細胞中に取り込まれることになるが、この方法では小孔は加熱形成されるため、細胞膜が傷つきやすく、DNAの取り込み後も小孔が残存することになる。

これに対して、従来技術の第2のものとしての電気穿孔法によれば、細胞を含む媒液に直流パルス電場を印加することにより細胞膜に小孔が形成され、この小孔を介してDNAなどが取り込まれる。この電気穿孔法によれば細胞膜が特に傷つけられることがなく、また直流パルス電場の印加を

あらかじめ含まれているDNAなどの被取込物を前記細胞中の取込部分に取り込む細胞電気穿孔法において、直流パルス電場の電気力線方向の一方側に細胞の取込部分（例えば核の近傍部分）を位置せしめる第1のステップと、上記電気力線方向の他方側の細胞部分を選択的にレーザービームなどで加熱すると共に、直流パルス電場を印加する第2のステップとを備えることを特徴とする。

また、本発明に係る細胞電気穿孔法は、媒液中に複数の細胞が含まれている場合において、直流パルス電場を印加することで形成した小孔を介して複数の細胞中の所定の細胞に被取込物を取り込むに際し、上記所定の細胞以外の細胞をレーザービームなどで選択的に加熱すると共に、直流パルス電場を印加するステップを備えることを特徴としてよい。

さらに、本発明に係る細胞電気穿孔装置は、細胞を含む媒液を入れるための凹部が形成され、かつ媒液に電場を印加するための一対の電極が凹部に設けられた基体と、上記の一対の電極に直流パ

ルス電圧を印加する電源と、基体の凹部に入れられた媒液中の細胞を観察するための顕微鏡と、基体の凹部に入れられた媒液中の細胞加熱するためのレーザ光源とを備えることを特徴とする。

〔作用〕

本発明の構成によれば、媒液中の1個の細胞の特定の部位、もしくは複数の細胞中の一部の細胞のみが選択的に加熱され、この条件下で直流パルス電場による電気穿孔がなされる。ここで、電気穿孔された細胞膜の小孔の修復は加熱条件下では速くなされるため、小孔の開状態の時間は相対的に短くなっている。これに対し、加熱されていない特定の部位もしくは特定の細胞の細胞膜の小孔は遅く修復されることになり、小孔の開状態の時間は相対的に長くなるので、この部分では長い時間にわたってDNAなどが取り込まれることになる。このため、細胞の特定の部位もしくは特定の細胞にDNAを選択的に取り込むことが可能になる。

17中の細胞16に照射されるようになっている。一方、基体1の下方にはリレーレンズ5を介して白色光源6が設けられ、ここからの光は細胞16を通して光学顕微鏡3で拡大され、観察者7に観察光 L_2 として届くようになっている。なお、図中のMは全反射ミラーであり、BSはビームスプリックである。

次に、第3図により上記実施例の作用を説明する。

第3図において、図示しない媒液中に含まれた細胞16は依16aを有しているものとする。いま、第3図の状態で電極13a、13bの間に直流パルス電場を印加すると、細胞16の電気力線方向の一方および他方側の端部 P_1 、 P_2 に、電気穿孔による小孔が形成される。この小孔は、直流パルス電場を加えることで開状態となり、直流パルス電場を解除すると修復していく。

ところで、この小孔の形成および修復速度は、その部分の温度により異なり、高温のときには形成および修復が共に速くなり、低温のときには形

〔実施例〕

以下、添付図面を参照して、本発明の実施例を説明する。

第1図は本発明に係る細胞電気穿孔法の実施例を適用した装置の基本構成図であり、第2図は第1図中の基体1の斜視図である。第2図の通り、基体1は例えば石英ガラス製の基板11を有し、この基板11の中央部には平面形状が四辺形の凹部12が形成されている。凹部12の対向する側壁には一対の電極13a、13bが例えばプラチナ(Pt)で形成され、これにはリード線14a、14bが接続されている。この基板11の凹部12には細胞16を含む媒液17が所定量だけ入れられ、第1図のようにセットされる。

すなわち、第1図に示すように、リード線14a、14bは直流パルス電源2に接続され、これによって媒液17に直流パルス電場が印加されるようになっている。細胞16の状態は光学顕微鏡3により観察され、かつレーザ光源4からのレーザビーム L_1 が光学顕微鏡3を介して媒液

成および修復が共に遅くなる。そこで、第3図中の記号LAで示す部分にのみレーザ光を照射し、この部分を加熱した状態で直流パルス電場を印加すると、レーザ光加熱された部分LA中の細胞部分 P_1 の小孔は開状態となっている合計時間が相対的に短く、加熱されていない他方の細胞部分 P_2 の小孔は開状態となっている合計時間が相対的に長くなる。その結果、加熱されていない細胞部分 P_2 の小孔を介して、媒液17中のDNAがより多く取り込まれることになる。

DNAの具体的な取り込み手順としては、次のようなものがある。

まず、電気穿孔されるのは直流パルス電場の電気力線方向端部の細胞膜であるので、DNAを取り込むべき取込部を上記直流パルス電場の電気力線方向に位置決めする。この具体的方法としては、例えば基体1を光学顕微鏡3で観察しながら回転、移動させればよい。また、例えば高周波電場を印加することで公知のバールチェーン現象を生起させ、細胞16を特定方向に向けるようにしてもよ

い。

次に、複数の細胞中の特定細胞もしくは1個の細胞の特定部位の加熱は、レーザ光照射により行なうが、このレーザ光照射に先立って細胞16を染色することが望ましい。色素としては細胞16に対する毒性の少ない低発光性のものを用いる。このようにすれば、パルスレーザあるいはCWレーザを用いることにより、特定部分のレーザ光照射でここを選択的に加熱することができる。なお、選択的なレーザ光照射は、光学顕微鏡3で細胞16の位置や向きを確認しながら、レーザビームを走査することで行なう。一方、1個の細胞の加熱したい部分あるいは複数の細胞中の加熱したい特定の細胞のみ染色しておけば、全体にレーザ光照射しても選択的な加熱ができる。

次に、上記のような加熱条件下で、直流パルス電場を印加して電気穿孔する。この直流パルス電場は1〜数 μ secのパルス幅、1〜数secのパルス間隔で数回行なう。なお、直流パルス電場の印加タイミングとレーザ光の照射タイミングに

ついては、細胞膜の形成あるいは修復過程で選択的に加熱できるものであれば、いかなるタイミングであってもよい。以上のようにして電気穿孔すると、媒液17に含まれたDNAが細胞16中に選択的に取り込まれることになる。

第4図はDNAの取り込みのいくつかの例を具体的に示している。同図において、記号Eは直流パルス電場による電気力線方向であり、記号Lはレーザ光照射により加熱される部分である。また、図中の斜線で示した部分は、相対的に開状態の大きな小孔が形成される部分である。同図(a)によれば、核16aの近傍にのみ制御性よくDNAを取り込むことができる。同図(b)の例によれば、レーザビームのスキャンを簡単に行なうながら、核16aの近傍にのみDNAを取り込むことができる。同図(c)の例によれば、7個の細胞中の2個の細胞のみに選択的にDNAを取り込むことができる。また、同図(d)の例によれば、4個の分裂した細胞中の1個の細胞についてのみ、選択的にDNAを取り込むことができる。

次に、本発明者による具体的な実施例を説明する。

まず、一辺が1cmで深さが3mmの凹部を中央に形成した石英ガラス板を用意し、この凹部に第2図のような電極対を白金(Pl)で形成した。そして、電極対には電圧およびパルス幅が可変でパルス間隔が1秒の直流パルス電源を接続した。更に、石英ガラスからなる基板の下方には白色光源を置き、凹部の上方に光学顕微鏡の対物レンズを対向させた。さらに、アルゴン(Ar)レーザ装置をセットし、レーザビーム照射できるようにした。上記装置を用いて、カロチン系色素で染色されたウニの卵および人間の赤血球による実験を行なった。

実施例 1

海水と略同一濃度のシヨ糖水溶液を1ml用意し、この中に生きたウニの卵を50個程度入れ試料液とした。次に、この試料液を石英ガラス板の凹部に1〜2mmの深さになるまで垂らし、顕微鏡で確認して処理対象のウニの卵を選び出した。次に、

スポット径が5 μ mのArレーザビームを選び出した細胞の一方の側だけにスキャンして照射し、パルス幅が5 μ sec、パルス間隔が1.0secの直流パルス電場を、1.5KV/cmの強さで10回印加した。その結果、加熱されていないウニの卵の細胞部分には加熱された部分に対して5倍の量で、シヨ糖水溶液中のDNAが取り込まれた。

比較例 1

実施例1において、Arレーザビームの照射以外を全く同一条件にして、DNAの取込実験を行なった。その結果、DNAの取込量は直流パルス電場の電気力線方向において略同一であった。

実施例 2

人間の血液と略同一濃度のシヨ糖水溶液を1ml用意し、この中に生きた赤血球を50個程度入れ試料液とした。次に、この試料液を石英ガラス板の凹部に1〜2mmの深さになるまで垂らし、顕微鏡で確認して処理対象の赤血球を6個だけ選び出した。次に、スポット径が5 μ mのArレーザビ

ームを選び出した6個の細胞のうちの4個のみにスキャンして照射し、パルス幅が $1.5 \mu\text{sec}$ 、パルス間隔が 1.0sec の直流パルス電場を、 $1.5 \text{V}/\text{cm}$ の強さで10回印加した。その結果、加熱されていない2個の赤血球には加熱された4個の赤血球に対して5倍の量で、ショ糖水溶液中のDNAが取り込まれた。

比較例2

実施例1において、Arレーザービームの照射以外を全く同一条件にして、DNAの取込実験を行った。その結果、DNAの取込量は6個の赤血球において略同一であった。

〔発明の効果〕

以上、詳細に説明した通り本発明では、媒液中の1個の細胞の特定の部位、もしくは複数の細胞中の特定の細胞のみが選択的に加熱され、この条件下で直流パルス電場による電気穿孔がなされるので、加熱されていない細胞の特定の部位もしくは特定の細胞の細胞膜の小孔は遅く修復されることになり、ここから長い時間にわたってDNA

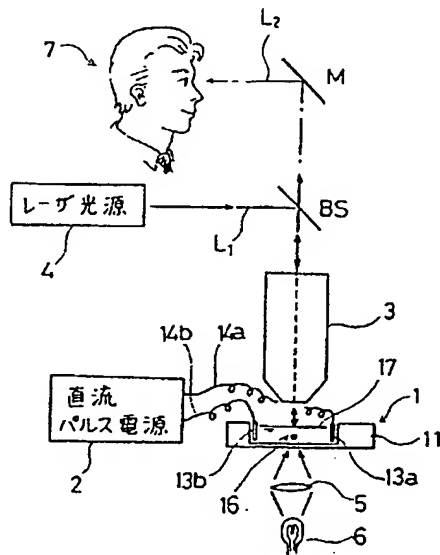
などが取り込まれることになる。このため、細胞の特定の部位もしくは特定の細胞にDNAを選択的に取り込むことが可能になる。

4. 図面の簡単な説明

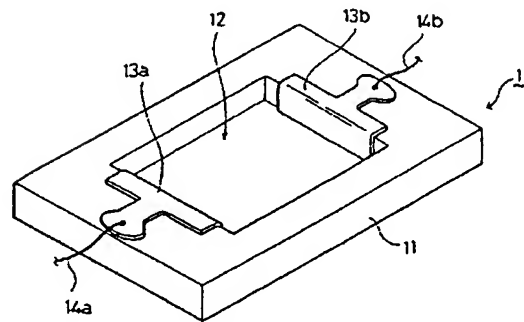
第1図は、本発明の実施例に係る細胞電気穿孔装置の基本構成図、第2図は、第1図に示す基体の斜視図、第3図は、実施例の作用を説明する図、第4図は、実施例によるDNAの取り込み例を説明する図である。

1…基体、12…凹部、13a、13b…電極、2…直流パルス電源、3…光学顕微鏡、4…レーザー光源、5…リレーレンズ、6…白色光源、7…観察者

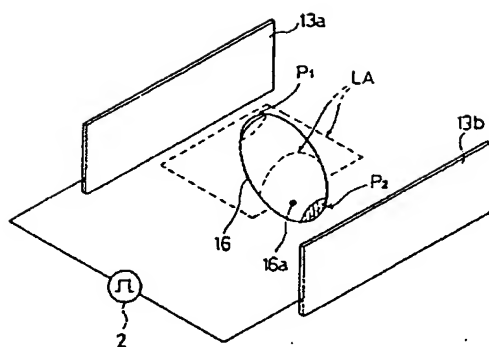
特許出願人 浜松ホトニクス株式会社
代理人 弁理士 長谷川 芳 樹



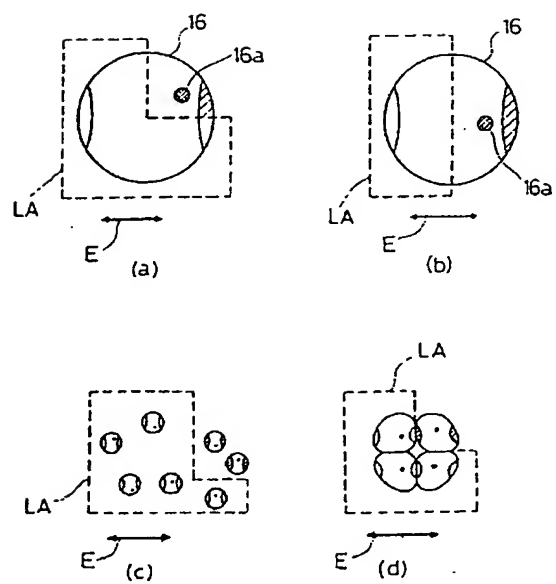
実施例に係る装置の基本構成
第1図



第1図の基体の斜視図
第2図



実施例の作用を説明する図
第3図



実施例によるDNAの取り込み例
第4図